

19



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

11

Veröffentlichungsnummer:

**0 384 122  
A2**

12

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

21

Anmeldenummer: 90101045.4

51

Int. Cl. 5: **C12N 15/15, C12P 21/02,  
A61K 37/64**

22

Anmeldetag: 19.01.90

Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten:  
ES + GR.

30

Priorität: 24.01.89 DE 3901917

43

Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
29.08.90 Patentblatt 90/35

84

Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE

71

Anmelder: **BEHRINGWERKE  
Aktiengesellschaft  
Postfach 1140  
D-3550 Marburg 1(DE)**

72

Erfinder: Zettlmeissl, Gerd, Dr.  
Am Hofacker 15  
D-3551 Lahntal(DE)  
Erfinder: Karges, Hermann Erich, Dr.  
Sonnenweg 32  
D-3550 Marburg(DE)  
Erfinder: Becker, Achim  
Oberlandstrasse 4  
D-3563 Dautphetal(DE)

74

Vertreter: Klein, Otto, Dr. et al  
Hoechst AG Zentrale Patentabteilung  
Postfach 80 03 20  
D-6230 Frankfurt am Main 80(DE)

54

**Mutanten von humanem Antithrombin III.**

57

Mutanten von AT III werden beschrieben, die an einer oder mehreren potentiellen Glykosylierungsstellen oder an der Position Arg393 vorteilhaft verändert sind. Die Kombination der Mutationen bewirkt in der Regel eine Potenzierung der vorteilhaften Veränderungen.

**EP 0 384 122 A2**

## Mutanten von humanem Antithrombin III

Die Erfindung betrifft Mutanten von AT III, die gegenüber Wildtyp AT III verbesserte Eigenschaften besitzen. Die Veränderung an einer oder mehreren potentiellen Glykosylierungsstellen (z.B. Asn 135, Asn 155) erhöht die Heparinbindungs-/Heparinaktivierungseigenschaften unter Beibehaltung der Proteasespezifität von AT III. Änderungen an Pos. Arg 393 führen zu Änderungen der Spezifität gegenüber Proteasen. Die Kombination der Mutationen bewirkt in der Regel eine Potenzierung der Verbesserungen.

Die für humanes Antithrombin III (AT III) kodierende cDNA und deren Expression in E.coli sind in der europäischen Patentanmeldung EP 0 090 505 A2 beschrieben. Darüberhinaus ist die Expression von AT III in rekombinanten Hefen (EP 0 256 302 A2) und Säugerzellen (DE 3 624 453 A1) gezeigt. Bei diesen Experimenten stellte sich heraus, daß nur AT III, welches von Säugerzellen ins Kulturmedium sezerniert wird, vollständige biologische Aktivität in vitro zeigt und eine dem Plasmaprotein sehr ähnliche komplexe Kohlehydratstruktur besitzt (Zettlmeißl et al., BioTechnology, 1987, 5, 720-725).

Das Molekulargewicht von rekombinantem AT III aus Säugerzellen entspricht mit ca. 58 kd dem des aus Plasma gereinigten Proteins. Die Aminosäuresequenz von reifem humanem AT III ist in Tab. 1 dargestellt.

AT III ist ein Mitglied der Proteinfamilie der Serpine und besitzt demnach hohe Homologie zu Proteaseinhibitoren wie Alpha-1-Antitrypsin, Alpha-2-Antiplasmin, Heparinkofaktor II, Alpha-1-Antichymotrypsin, Plasminogenaktivator inhibitor, etc. Wenn die Serinprotease Thrombin mit AT III interagiert, spaltet sie die Arg393-Ser394 Bindung und es kommt zur Ausbildung eines kovalenten AT III-Thrombin-Komplexes. Mit der Komplexbildung verliert Thrombin seine Proteaseaktivität. In Abwesenheit von Heparin ist AT III ein relativ schlechter Inhibitor von Thrombin. Durch optimale Konzentrationen von Heparin wird die Geschwindigkeitskonstante der AT III-Thrombinassoziationsreaktion um mindestens Faktor 2000 gesteigert (Hoylaerts et al., J. Biol. Chem., 1984, 259, 5670-5677). Im menschlichen Plasma existieren zwei Formen von AT III (alpha und beta) mit unterschiedlicher Heparinaffinität (Peterson und Blackburn, J. Biol. Chem., 1985, 260, 610-615; Brennan et al., FEBS LETT., 1987, 219, 431-436). Während AT IIIalpha, das zur 90-95% im Plasma vorkommt, an den Asn-Resten 96, 135, 155 und 192 Kohlehydratseitenketten trägt, sind bei AT IIIbeta nur die Stellen 96, 155 und 192 besetzt. Die physiologische Rolle der beiden AT III-Formen ist nicht bekannt.

Die Technik der gezielten Mutagenese erlaubt es, spezifische Änderungen in die AT III cDNA einzubringen, die zu Veränderungen in der Aminosäurezusammensetzung von AT III führen. Methoden zur gezielten Mutagenese, die mit Einzelstrang DNA bzw. Heteroduplex DNA arbeiten, sind bekannt (Morinaga et al., BioTechnology, 1984, 7, 636-639; Kramer et al., Nucl. Acid Res., 198, 12, 9441-9456). Tab. 2 zeigt beispielhaft einige Oligonukleotide, wie sie zur gezielten Mutagenese von humanem AT III eingesetzt wurden.

Es wurden nun Mutanten hergestellt, die an einer oder mehr der Glykosylierungsstellen Asn 96, Asn 135, Asn 155, Asn 192 eine andere Aminosäure, vorzugsweise Gln, tragen, was die Heparinbindungs-/Heparinaktivierungseigenschaften unter Beibehaltung der Proteasespezifität verbessert; ferner wurden Mutanten hergestellt, die an Position Arg393 (vorzugsweise Mutation zu Met oder Val) verändert sind, was eine Veränderung der Enzymspezifität bewirkt.

Mutanten mit verbesserten Heparinbindungs-/Heparinaktivierungseigenschaften besitzen Vorteile bei der AT III/Heparin-Kotherapie, weil gegebenenfalls mit niedrigeren Heparindosen therapiert werden kann.

Spezifitätsmutanten hingegen führen zu neuen Molekülen, bei denen die Eigenschaft der Heparinaktivierbarkeit von AT III auf mutierte Moleküle mit Affinität zu neuen Proteasen (z.B. Elastase, Plasmin etc.) übertragen werden kann, so daß solche Moleküle vorteilhafte, geänderte Therapiekonzepte aufgrund geänderter Dosierungen gestatten.

Mutierte AT III Proteine können in Säugerzellen exprimiert, über Standardmethoden gereinigt und bezüglich ihrer Proteasespezifität bzw. ihrer Heparinaktivierungseigenschaften, ihrer biochemisch/biophysikalischen Eigenschaften und/oder bezüglich klinischer Parameter untersucht werden. Die Synthese von veränderten Formen von AT III wird durch ein Vektor-Wirt-Zellsystem, das schnell zu hohen Expressionsraten führt, erreicht (Zettlmeißl et al. (1988) Behring Inst. Mitt. 82, 26-34).

Die Erfindung betrifft folglich AT III-Mutanten, die

(1) an einer oder mehr der Glykosylierungsstellen Asn 96, Asn 135, Asn 155, Asn 192 eine andere Aminosäure, vorzugsweise Gln, tragen,

(2) an Position Arg 393 (vorzugsweise Mutation zu Met oder Val) verändert sind,

(3) eine Kombination der Mutationen von (1) und (2) besitzen, die in der Regel eine Potenzierung der Verbesserungen bewirken.

Die Erfindung ist ferner in den Beispielen und in den Patentansprüchen beschrieben.

#### Beispiel 1: Synthese von AT III-Mutanten (Allgemeines Verfahren)

Aus dem Plasmid p $\beta$ AT6 (EP 0 256 302 A2) wurde durch Verdauung mit EcoRI/HindIII ein 1,4 kb Fragment isoliert, das den gesamten kodierenden Bereich der humanen AT III cDNA enthält. Dieses Fragment wurde in den Polylinker (EcoRI/HindIII-gespalten) des Mutagenesevektors pMA 5-8 (Fig. 1) kloniert. Das resultierende Plasmid wurde pMAATIII genannt (Fig. 2).

Nach Durchführung der Mutagenese (s.u.: Beschreibung "Mutagenese") wurde die mutierte cDNA durch Schneiden mit SacII/XbaI isoliert und in den Expressionsvektor pAB 3-1 (AT III Wildtyp), der ebenfalls mit SacII/XbaI verdaut wurde, kloniert, was zu dem Plasmid pABmut führte (Fig. 3). Die pABmut-Plasmide tragen neben der jeweiligen mutierten cDNA die SV40 "early" Enhancer/Promotor-Einheit, die SV40 Polyadenylierungsstelle für frühe Transkripte und den CMV "immediate early" Enhancer (Zettlmeißl et al. a.a.O.).

Die pABmut-Plasmide wurden über CsCl-Gradienten gereinigt und, wie bei Zettlmeißl et al., a.a.O. beschrieben, mit den Plasmiden pSV2dhfr und pRMH140 in BHK-Zellen (ATCC CCL10) kotransfiziert. Nach Doppelsektion in DME-Medium + 10% FKS + 400  $\mu$ g/ml G418 und 1  $\mu$ M Methotrexat (Standardwachstumsmedium) wurden die auftretenden resistenten Klone (ca. 40 - 100) als Klommischung in T25-Kulturgefäßen vereinigt. Die Mischklone wurden über T80 und T180 Kulturgefäße in Standardwachstumsmedium auf Plastikrollerflaschen (1750 cm<sup>2</sup>) expandiert und dort adhärenz zur Konfluenz gezüchtet. Die konfluenten Zellen wurden zweimal mit 200 ml Iscove's Medium (Behringwerke AG, Marburg) gewaschen (je 2 Stunden bei 37°C) und anschließend mit 500 ml desselben Mediums als Erntemedium 48 Stunden lang gerollt. Das Erntemedium wurde durch Zentrifugation von zellulären Bestandteilen befreit. Aliquots der konditionierten Erntemedien wurden in einem für humanes AT III spezifischen ELISA (Zettlmeißl et al. 1987, BioTechnology 5, 720-725) bezüglich ihres AT III-Antigengehalts untersucht. Hierbei ermittelte Expressionswerte für Wildtyp AT III (AT III-WT) und verschiedene Mutanten sind in Tab. 3 exemplarisch angegeben.

AT III-WT und davon abgeleitete mutierte Proteine wurden aus den Erntemedien nach einem Standardverfahren (Affinitätschromatographie mit Heparin-Sepharose, gefolgt von fraktionierter Ammoniumsulfatfällung) aufgereinigt (Zettlmeißl et al. 1987) und anschließend charakterisiert.

Mutante AT III Moleküle können auch mit anderen Expressionsvektoren in verschiedenen permanenten Säugerzelllinien entsprechend dem Stand der Technik exprimiert werden.

#### Beispiel 2: Mutagenese / Allgemeines Verfahren (Kramer et al., Nucl. Acids Res. (1984) 12, 9441-9456)

Einzelstrang DNA des Mutagenesevektors pMAATIII (Fig. 2), welcher in dem E.coli Stamm WK6 transformiert worden war, wurde nach Standardmethoden isoliert.

Plasmid DNA von PMC5-8 (siehe Legende zu Fig. 1) wurde mit EcoRI/HindIII geschnitten und das Vektorfragment (3.8kb) aus einem Agarosegel über Papierelution (Maniatis et al. 1982, Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York) gereinigt.

Zur Herstellung einer "gapped-duplex" DNA wurden 0,1 pmol doppelsträngiges Fragment (aus pMC) und 0,5 pmol Einzelstrang DNA (pMAATIII) in 12,5 mM Tris-HCl pH 7,5 + 190 mM KCl (Endvolumen 40  $\mu$ l) für 4 Minuten bei 100°C erhitzt und anschließend 10 Minuten bei 65°C inkubiert. Zur Anhybridisierung des Mutageneseoligonukleotids (s. Tab. 2) wurden 8  $\mu$ l der genannten Hybridisierungslösung mit 4 - 8 pmol (2  $\mu$ l) des enzymatisch phosphorylierten Oligonukleotids für 5 Minuten auf 65°C erhitzt und dann langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach Zugabe von 24  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 4  $\mu$ l 10fachem "fill-in" Puffer (625 mM KCl, 275 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM DTT, 0,5 mM ATP und je 0,25 mM der vier dNTP's), 1  $\mu$ l T4-DNA-Ligase (5 U/ $\mu$ l) und 1  $\mu$ l Klenow-Fragment der DNA Polymerase I (1 U/ $\mu$ l) folgte eine 45minütige Inkubation bei Raumtemperatur. 5  $\mu$ l aufgefüllter gapped-duplex DNA wurden in WK6 muts (mutS215:Tn10) transformiert. Der gesamte Transformationsansatz wird in einer Schüttelkultur in LB-Medium + 25  $\mu$ g/ml Chloramphenicol (10 ml) über Nacht bei 37°C vermehrt. Aus dem gesamten Ansatz wurde die Plasmid-DNA nach Standardmethoden gereinigt (Maniatis et al. 1982). Etwa 20 ng des gereinigten Plasmids wurden in WK6 transformiert. Die Transformanten wurden auf LB-Platten mit 25  $\mu$ g/ml Chloramphenicol selektiert.

Fünf dieser Transformanten wurden durch eine geeignete Sequenzreaktion (C-, T-, A- oder G-spezifisch) auf die gewünschte Mutation hin analysiert. Positive Klone wurden durch detaillierte Sequenzanalyse im Bereich der Mutagenesestelle bestätigt (Sanger et al. (1977), Proc.Natl. Acad.Sci. USA 74, 5463-

5467).

Beispiel 3: AT III - Met 393; AT III - Val 393 und AT III - Leu 393

5 Mit dem Ziel, ein Molekül mit Alpha-Antitrypsin ähnlicher Spezifität (Elastaseinhibitor) zu erzeugen, wurde Arg393 von AT III (P1-Position) in ein Met, Val bzw. Leu umgewandelt. Zur Mutagenese wurden die Oligonukleotide Nr. 1, 2 und 3 aus Tab. 2 eingesetzt.

10 Die Mutanten werden in vergleichbaren Mengen wie AT III-Wildtyp (WT) von BHK-Zellen synthetisiert und ins Kulturmedium ausgeschleut (Tab.4), zeigen im Vergleich zu AT III-Plasma und AT III-WT identisches Verhalten gegenüber anti-AT III-Seren aus Kaninchen und lassen sich in Analogie zum AT III-WT nach dem oben beschriebenen Standardverfahren zu Reinheiten größer 95% aufreinigen. Das Bindungs- und Elutionsverhalten dieser Mutanten auf Heparinsepharose zeigt keinen Unterschied zu AT III-WT. Dies weist auf intaktes Heparinbindungs- und Heparinaktivierungsverhalten der Mutante hin.

15 Die Mutanten zeigen keine Progressivinhibitor- (Hensen et al., 1963, Thromb. Diatl. Haemorrh. 9, 18-29) und Heparinkofaktoraktivität (Schrader et al., 1986, Ärtzl. Lab. 32, 111-114) gegenüber Thrombin mehr (Tab. 3).

Die drei Mutanten inhibieren im Gegensatz zu AT III-WT Leukozyten-Elastase. Die Elastase wurde aus menschlichen Leukozyten nach der von Engelbrecht et al. (Hoppe-Seyler's Ztschr. Physiol. Chemie 363, 305-315, 1982) beschriebenen Methode isoliert. Als Substrat wurde das von Nakajima et al. (J. Biol. Chem. 254, 4027-4032, 1979) beschriebene MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA (Calbiochem) benutzt. Die Freisetzung des Paranitroanilins aus dem Substrat wurde als Zunahme der Absorption bei 405 nm im Spektralphotometer innerhalb von 15 min. gemessen. Dieser Absorptionswert wurde als 100 % Enzymaktivität der PMN Elastase definiert. Die Inhibitoren wurden in steigenden Konzentrationen bis maximal 100 µg/ml für eine Stunde mit dem Enzym vorinkubiert. Die Enzymreaktion wurde dann mit dem Substrat gestartet. Der Test wurde in 0.1 mol/l HEPES, pH 7.5, + 0.1 mol/l Natriumchlorid durchgeführt. Die Substratkonzentration betrug 0.13 mmol/l. Als IC50 in µg/ml wurde diejenige Inhibitorkonzentration bezeichnet, die 50% der Enzymaktivität inhibierte. Substanzen, die bei einer Maximalkonzentration von 100 µg/ml keine inhibierende Wirkung zeigten, wurden als wirkungslos definiert. Als Referenzinhibitor diente alpha1-Proteaseinhibitor (alpha1-PI, alpha1-Antitrypsin), der einen Inhibitionswert von 3.7 hatte. AT III-WT zeigte keine Hemmung der PMN Elastaseaktivität. AT III Val zeigte eine dem alpha1-PI vergleichbare Aktivität von 4.0 µg/ml, während AT III Met und AT III Leu mit 28 bzw. 65 µg/ml deutlich weniger aktiv waren (s. nachfolgende Tabelle).

20 Mit dem beschriebenen PMN-Elastase Test wurde für AT III -Val 393 im Vergleich zu alpha1 PI die KI-Bestimmung durchgeführt. Die eingesetzten Konzentrationen des Substrates MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA betrugen 0.0011, 0.0022, 0.0044, 0.0087, 0.0175, 0.035, 0.7 mmol/l. Die Konzentration des Inhibitors betrug  $3,5 \times 10^{-8}$  mol/l.

In beiden Fällen handelt es sich bei der Hemmung der PMN-Elastase um eine nicht kompetitive Hemmung (s. nachfolgende Tabelle). Die KI-Werte für alpha1 PI und AT III - Val 393 sind nahezu identisch.

Beispiel 4: AT III-Gln135 und AT III-Gln155

40 Ein Ziel der in dieser Anmeldung als Erfindung beanspruchten Experimente ist es, den Einfluß der Glykosylierung im AT III Molekül auf die biologischen und biochemischen Eigenschaften von AT III zu untersuchen.

45 Durch Asn→Gln Austausch in den Positionen 135 bzw. 155 wurden zwei AT III-Mutanten (AT III-Gln135 und AT III-Gln155) erzeugt, denen jeweils eine Kohlehydratseitenkette fehlt. Als Mutageneseoligonukleotide wurden die Oligonukleotide 8 und 9 (Tab. 2) eingesetzt. Die Expressionsraten für beide Mutanten in BHK-Zellen (AT III im Kulturmedium) liegen, wie in Tab. 4 gezeigt, in derselben Größenordnung wie für AT III-WT. Beide Mutanten zeigen im Vergleich zu AT III-Plasma und AT III-WT identisches Verhalten gegenüber anti-AT III-Seren aus Kaninchen, bezüglich spezifischer Progressivinhibitor- und Heparinkofaktoraktivität (Tab. 4) und lassen sich nach dem oben beschriebenen Standardverfahren zu Reinheiten größer 95% aufreinigen.

50 Beide Mutanten wurden bezüglich ihrer relativen Thrombininaktivierungsfähigkeit in Abhängigkeit von der Heparinkonzentration im Test untersucht und mit AT III-Plasma, AT III-WT bzw. der Mutante AT III-Lys49 verglichen (Tab. 5).

55 Der Test wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 0,02 U (Antigen)/ml AT III (AT III-Plasma, AT III-WT oder AT III-Mut) wurden mit 0,3 IU/ml alpha-Thrombin (human), 2 KIU/ml Aprotinin (Behringwerke)

und Heparin (Hoffmann-LaRoche) in Konzentrationen von 0 - 25 IU/ml wurden in einem Volumen von 1 ml 5 Minuten bei 37° C vorinkubiert. Nach Zugabe von 100 µl Substratreagenz (2 mM HD-CHA-But-Arg-pNA) wurde die Extinktionsänderung bei 405 nm (37° C) kinetisch verfolgt. Maximale Inhibition von alpha-Thrombin bei Heparinsättigung wurde 100% gesetzt.

Die Mutanten AT III-Gln135 und AT III-Gln155 zeigen im Vergleich zu AT III-Plasma und AT III-WT eine verbesserte Inhibition von Thrombin bei niedrigen Heparinkonzentrationen (Tab. 5).

Tab. 5 gibt die Heparinkonzentration bei halbmaximaler Thrombininhibition (c 1/2) für AT III-Plasma, AT III-WT und verschiedene AT III-Mutanten an.

10

#### Beispiel 5: AT III-Gln135/155

Die in Beispiel 4 beschriebenen Mutationen wurden durch sequentielle Mutagenese mit den Oligonukleotiden 8 und 9 (Tab. 2) in einem AT III-Molekül vereinigt. Das mutierte Protein verhält sich im beschriebenen Standardreinigungsverfahren wie ein rekombinantes Wildtyp AT III-Molekül.

Die bei AT III-Gln135 und bei AT III-Gln155 verbesserte Inhibition von alpha-Thrombin bei niedrigen Heparinkonzentrationen ist im Falle von AT III-Gln135/155 noch stärker ausgeprägt (Tab. 5).

#### Tab. 1

20

25

```

30      1 HGSPVDICTA KPRDIPMNP M CIYRSPEKKA TEDEGSEQKI PEATNRRVWE
      51 LSKANSRFAT TFYQHLADSK NDNDNIFLSP LSISTAFAMT KLGACNDTLQ
      101 QLMEVFKFDT ISEKTSQDIH FFFAKLNCRL YRKANKSSKL VSANRLFQDK
      151 SLTFNETYQD ISELVYGAKL QPLDFKENAE QSRAAINKWV SNKTEGRITD
35      201 VIPSEAINEL TVLVLVNTIY FKGLWKS KFS PENTRKELFY KADGESCSAS
      251 MMYQEGKFRY RRVAEGTQVL ELPFKGDDIT MVLILPKPEK SLAKVEKELT
      301 PEVLQEWLDE LEEMMLVVHM PRFRIEDGFS LKEQLQDMGL VDLFSPEKSK
40      351 LPGIVAEGRD DLYVSDAFHK AFLEVNEEGS EAAASTAVVI AGRSLNPNRV
      401 TFKANRPFLV FIREVPLNTI IFMGRVANPC VK

```

45

50

55

Tab. 2

Beispiele für Mutageneseoligonukleotide		
No.	Sequenz	Mutation
1	5' GGG GTT TAG CGA <u>CAT</u> GCC AGC AAT CAC 3'	Arg393-Met
2	5' GGG GTT TAG CGA <u>AAC</u> GCC AGC AAT CAC 3'	Arg393-Val
3	5' GGG GTT TAG CGA <u>AAG</u> GCC AGC AAT CAC 3'	Arg393-Leu
4	5' GGG GTT TAG <u>CGT</u> <u>ACG</u> GCC AGC 3'	Ser394-Thr
5	5' GGG GTT TAG <u>CAT</u> ACG GCC AGC 3'	Ser394-Met
6	5' GGA CAG TTC <u>CTT</u> GAC ACG CCG G 3'	Trp49-Lys
7	5' G GAG GGT <u>GTC</u> <u>CTG</u> ACA GGC ACC CAG C 3'	Asn96-Gln
8	5' GGA GGA TTT <u>CTG</u> <u>GGC</u> TTT TCG	Asn135-Gln
9	5' G GTA GGT <u>CTC</u> <u>CTG</u> GAA GGT AAG G 3'	Asn155-Gln
10	5' CG GCC TTC GGT <u>CTT</u> <u>CTG</u> GGA CAC CC 3'	Asn192-Gln

Tab. 3

Inhibition der Elastase aus humanen polymorphkernigen Granulozyten (PMN Elastase)		
Substanz	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	k <sub>i</sub> (mol/l)
alpha <sub>1</sub> PI	3.7	1,7 x 10 <sup>-8</sup>
AT III - WT	-	n.b.
AT III - Met 393	28.0	n.b.
AT III - Val 393	4.0	1 x 10 <sup>-8</sup>
AT III - Leu 393	65.0	n.b.
- = keine Inhibition (IC <sub>50</sub> > 100 µg/ml)		
n.b. = nicht bestimmt		

Tab. 4

Expression und Reinigung von AT III-Mutanten				
	konz.in Rollerüberständen <sup>1)</sup> (mg/l)	Reinigung nach Standardverf.	PI <sup>2)</sup> (U/mg)	HC <sup>3)</sup> (U/mg)
ATIII-Plasma	-	+++	4-6,5*	4-6,5*
ATIII-WT	4,2	+++	6,2	5
ATIII-Met393	5,5	+++	0	0
ATIII-Val393	4,8	+++	0	0
ATIII-Leu393	9,8	+++	0	0
ATIII-Thr394	9,7	+++	n.b.	3,5
ATIII-Lys49	3,3	++	4,6	4,3
ATIII-Gln135	8	+++	3,9	4,5
ATIII-Gln155	3,6	+++	4,2	5,5
ATIII-Gln135/155	1,2	+++	n.b.	3,8

<sup>1)</sup> 48 h serumfreie Überstände (ELISA) von BHK-Zellen

<sup>2)</sup> Progressivinhibitoraktivität (Hensen et al. 1963)

<sup>3)</sup> Heparinkofaktoraktivität (Schrader et al. 1986)

n.b. = nicht bestimmt

\* = Charginabhängige Schwankungsbreite

Tab. 5

Abhängigkeit der Thrombininaktivierung von der Heparinkonzentration	
	c <sub>1/2</sub> Heparin <sup>1)</sup> (mIU/ml)
ATIII-Plasma	65
ATIII-WT	65
ATIII-Gln135	22
ATIII-Gln155	22
ATIII-Gln135/155	5
ATIII-Lys49	größer 360

<sup>1)</sup> Heparinkonzentration bei halbmaximaler relativer  
Thrombininhibition

#### Legende zu Fig. 1:

Karte der Plasmide pMAC5-8 (= pMA5-8 und pMC5-8).

F1-ORI: Replikationsursprung des Phagen f1;

ORI: Replikationsursprung vom ColE1-Typ;

CAT: Kodierende Region für Chloramphenicol-acetyl-transferase;

AMP: Kodierende Region für  $\beta$ -Lactamase.

pMA5-8 trägt eine amber-Mutation in CAT (A bei Position 3409) und pMC5-8 eine amber-Mutation in AMP (C bei Position 2238).

Legende zu Fig. 4:

Abhängigkeit der relativen Inhibition von humanem alphaThrombin durch AT III-Plasma (o), AT III-WT (□), AT III-Gln135 (●), AT III-Gln155 (■) und AT III-Lys (▼). Die experimentellen Bedingungen sind in Beispiel 4 beschrieben.

### Ansprüche

1. Antithrombin III (ATIII)-Mutanten, die Mutationen an den Positionen Trp49, Gln96, Gln135, Gln155, Gln192, Arg393, Thr394 einzeln oder in Kombination enthalten.
  2. ATIII-Mutanten nach Anspruch 1, die die Mutationen nach Tabelle 2 einzeln oder in Kombination enthalten.
  3. ATIII-Mutanten nach Anspruch 2, die eine Mutation nach Nr. 1, 2 oder 3 der Tabelle 2 zusammen mit einer oder mehreren der Mutationen nach Nr. 7 bis 10 der Tabelle 2 enthalten.
  4. ATIII-Mutanten nach Anspruch 2, die eine oder mehrere Mutationen nach Nr. 7 bis 10 der Tabelle 2 enthalten.
  5. ATIII-Mutante nach Anspruch 2, die die Mutation nach Nr. 1 der Tabelle 2 enthält.
  6. ATIII-Mutante nach Anspruch 2, die die Mutation nach Nr. 2 der Tabelle 2 enthält.
  7. ATIII-Mutante nach Anspruch 2, die die Mutation nach Nr. 3 der Tabelle 2 enthält.
  8. ATIII-Mutante nach Anspruch 2, die die Mutation nach Nr. 4 der Tabelle 2 enthält.
  9. ATIII-Mutante nach Anspruch 2, die die Mutation nach Nr. 5 der Tabelle 2 enthält.
  10. ATIII-Mutante nach Anspruch 2, die die Mutation nach Nr. 6 der Tabelle 2 enthält.
  11. ATIII-Mutante nach Anspruch 2, die die Mutation nach Nr. 7 der Tabelle 2 enthält.
  12. ATIII-Mutante nach Anspruch 2, die die Mutation nach Nr. 8 der Tabelle 2 enthält.
  13. ATIII-Mutante nach Anspruch 2, die die Mutation nach Nr. 9 der Tabelle 2 enthält.
  14. ATIII-Mutante nach Anspruch 2, die die Mutation nach Nr. 10 der Tabelle 2 enthält.
  15. Verfahren zur Herstellung einer der Mutanten nach Anspruch 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die dafür kodierende cDNA in geeigneten pro- oder eukaryotischen Expressionssystemen exprimiert wird.
  16. Arzneimittel, das eine oder mehrere der Mutanten nach Anspruch 1 bis 14 enthält.
- Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten: GR, ES

1. Verfahren zur Herstellung von Antithrombin III (ATIII)-Mutanten, die Mutationen an den Positionen Trp49, Gln96, Gln135, Gln155, Gln192, Arg393, Thr394 einzeln oder in Kombination enthalten, dadurch gekennzeichnet, daß die jeweils für die genannten Mutanten kodierende cDNA in geeigneten pro- oder eukaryotischen Expressionssystemen exprimiert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ATIII-Mutanten, die Mutationen nach Tabelle 2 einzeln oder in Kombination erhalten, hergestellt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß ATIII-Mutanten hergestellt werden, die eine Mutation nach Nr. 1, 2 oder 3 der Tabelle 2 zusammen mit einer oder mehreren Mutationen nach Nr. 7 bis 10 der Tabelle 2 enthalten.
4. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß ATIII-Mutanten hergestellt werden, die eine oder mehrere Mutationen nach Nr. 7 bis 10 der Tabelle 2 enthalten.
5. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß eine ATIII-Mutante hergestellt wird, die die Mutation nach Nr. 1 der Tabelle 2 enthält.
6. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß eine ATIII-Mutante hergestellt wird, die die Mutation nach Nr. 2 der Tabelle 2 enthält.
7. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß eine ATIII-Mutante hergestellt wird, die die Mutation nach Nr. 3 der Tabelle 2 enthält.
8. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß eine ATIII-Mutante hergestellt wird, die die Mutation nach Nr. 4 der Tabelle 2 enthält.
9. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß eine ATIII-Mutante hergestellt wird, die die Mutation nach Nr. 5 der Tabelle 2 enthält.
10. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß eine ATIII-Mutante hergestellt wird, die die Mutation nach Nr. 6 der Tabelle 2 enthält.
11. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß eine ATIII-Mutante hergestellt wird, die die Mutation nach Nr. 7 der Tabelle 2 enthält.
12. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß eine ATIII-Mutante hergestellt wird, die

die Mutation nach Nr. 8 der Tabelle 2 enthält.

13. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß eine ATIII-Mutante hergestellt wird, die die Mutation nach Nr. 9 der Tabelle 2 enthält.

14. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß eine ATIII-Mutante hergestellt wird, die  
5 die Mutation nach Nr. 10 der Tabelle 2 enthält.

15. Verfahren zur Herstellung von Arzneimitteln, dadurch gekennzeichnet, daß eine oder mehrere der Mutanten nach Anspruch 1 bis 14 mit handelsüblichen Trägermaterialien gemischt wird.

10

15

20

25

30

35

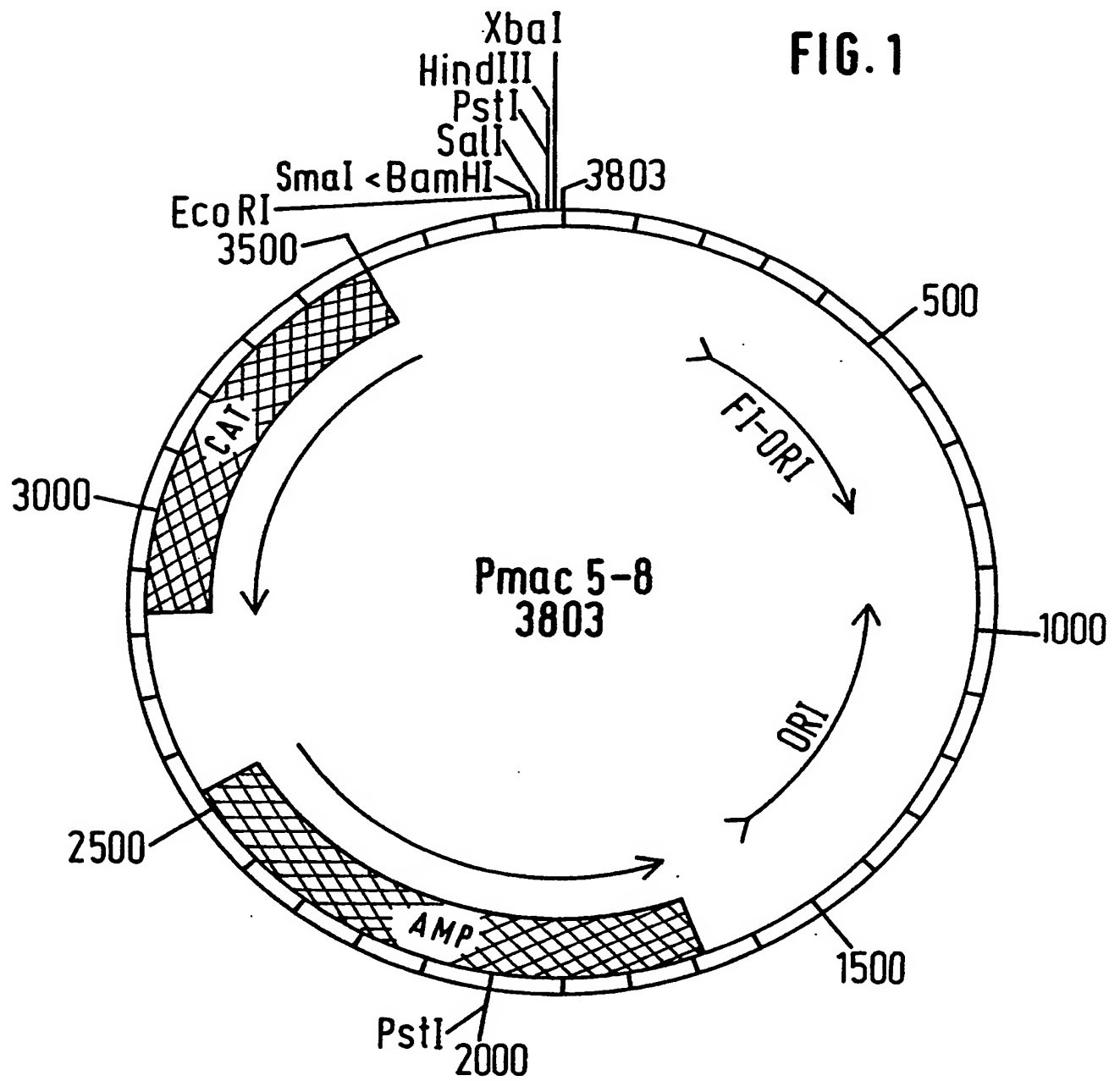
40

45

50

55

FIG. 1



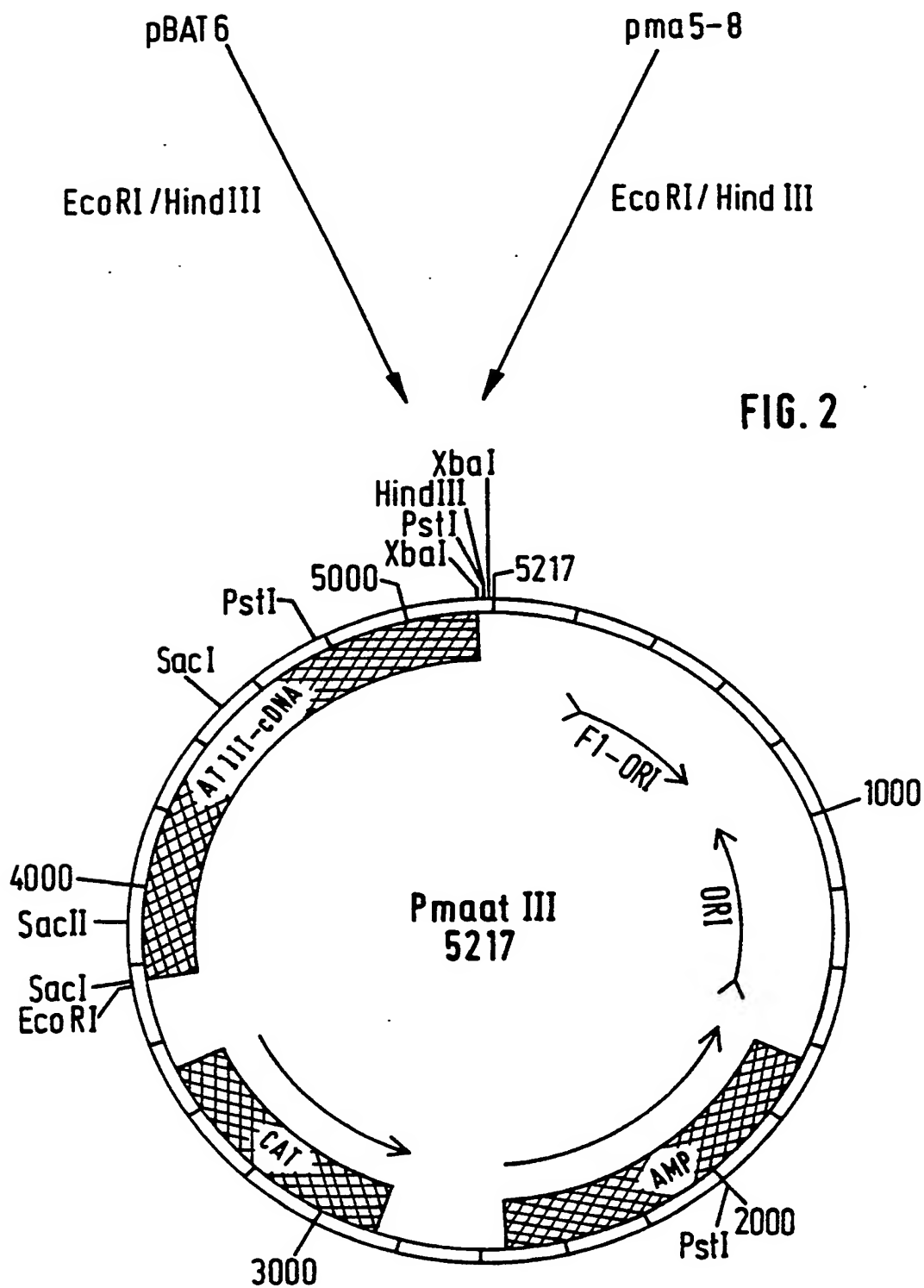
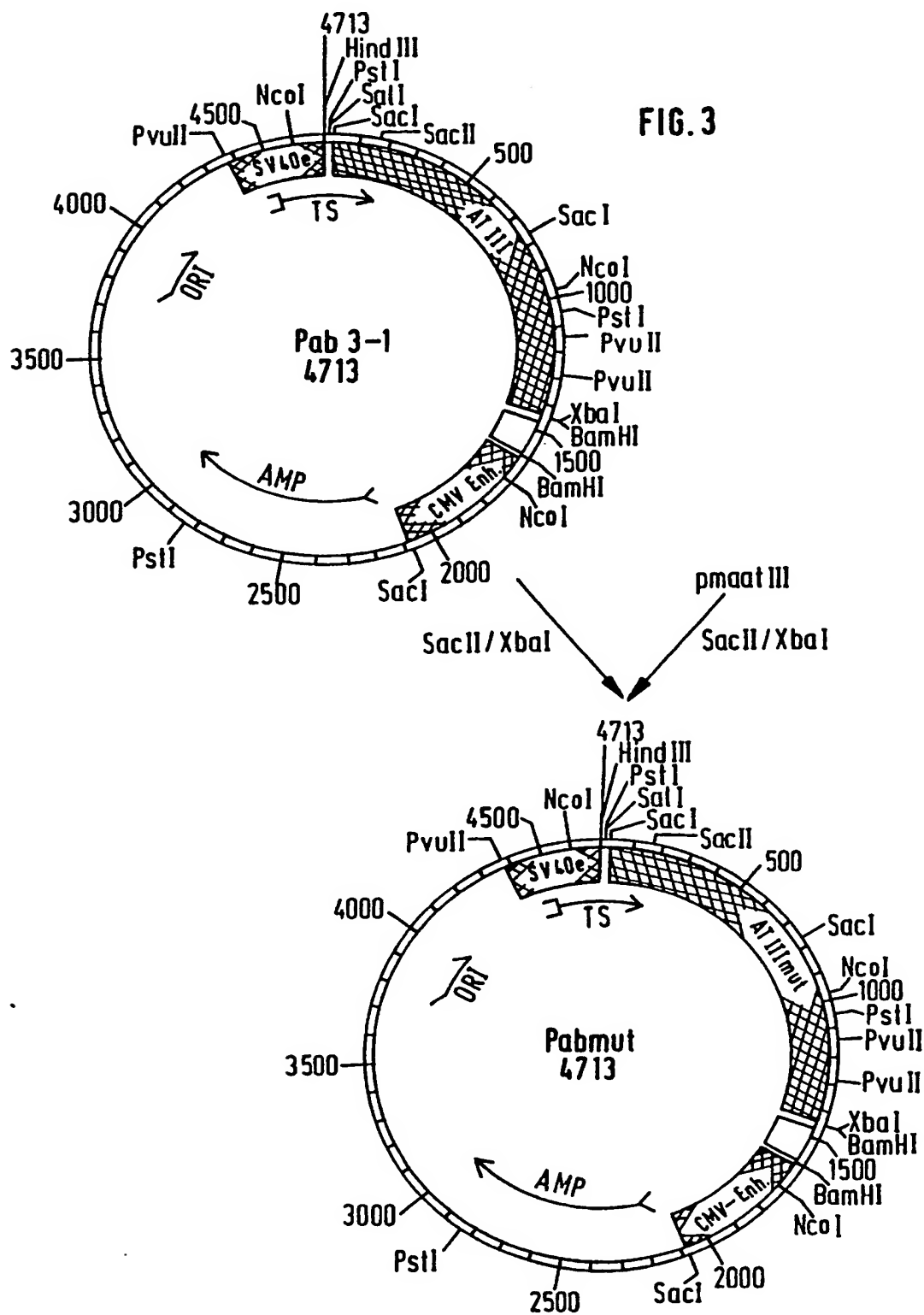


FIG. 2

FIG. 3



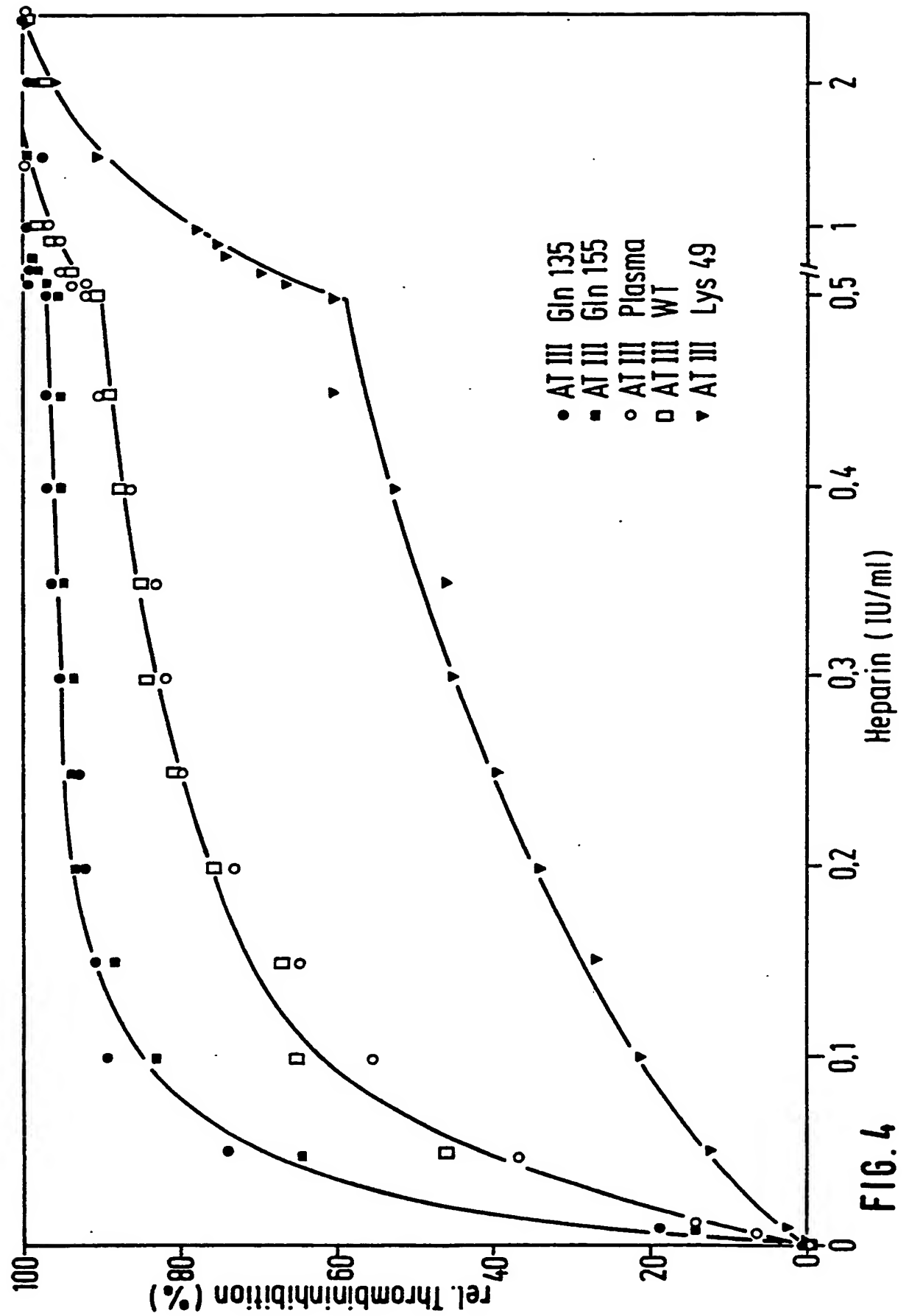


FIG. 4